

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 角 田 徹

アルカン資化性酵母はアルカン誘導型チトクローム P450 (P450ALK) によってアルカンの末端を酸化してアルカノールへと変換する。その後さらなる酸化反応によって、脂肪酸へと変換し、生じた脂肪酸を acyl-CoA を経て、一部を菌体内の脂質として取り込むほか、大部分をペルオキシソームでβ酸化によってさらに代謝する。酵母 *Yarrowia lipolytica* より P450ALK をコードする遺伝子が 8 種類 (*YIALK1*~*YIALK8*) 単離されている。これら 8 種類の遺伝子でアルカンによる誘導発現が認められるのは一部であり、これらの遺伝子の産物のアルカン代謝への関与には不明な点が多い。また、これらの遺伝子の発現調節機構は、転写因子を含め未だ解明されていない。

本研究は、このような背景の下に、*Y. lipolytica* における P450ALK をコードする遺伝子の転写制御機構、その遺伝子産物の基質特異性、細胞内へのアルカン輸送機構等を解明すべく研究を行ったものである。

第1章では *YIALK1* 遺伝子のプロモーター構造の解析を行っている。*YIALK1* は *YIALK* 遺伝子の中で最も発現レベルが高く、主要な役割を担う P450ALK をコードすると考えられていた。*YIALK1* プロモーター全長および上流から段階的に欠失させていったプロモーターを、大腸菌由来の *lacZ* 遺伝子と融合させ、β-galactosidase 活性を指標に測定した。その結果、開始コドン ATG の A を+1 とすると-400~-304 の領域がアルカン応答に関与していることを示し、この領域を ARR1 (alkane responsive region) と命名した。さらに ARR1 内の転写制御に関わる領域として 2 カ所あることを示唆した。次に、ARR1 内の様々な領域をプローブとし、アルカン培養菌体から調製した細胞抽出液を用い、ゲルシフト解析を行った。その結果、-394~-371 の領域と-325~-305 の領域に異なる蛋白質の結合があることを示し、これらの配列をそれぞれ ARE1 (alkane responsive element)、ARE2 と命名した。

第2章では *Y. lipolytica* のペルオキシソームの合成に関わる新規遺伝子 *YIPEX10* の解析を行っている。*YIPEX10* は *YIALK1* の転写能の低下する突然変異を相補する遺伝子として単離されたものである。そこで *YIPEX5* 破壊株と *YIPEX6* 破壊株を作製したところ、やはり *YIALK1* の mRNA レベルの低下を認めた。*n*-ドデカンおよびその中間代謝産物の存在下では *YIALK1* の転写レベルが抑制されることを示した。これらの結果により、*n*-アルカンの酸化後さらにペルオキシソームで代謝されない場合、初発の酸化を抑制する制御機構が存在することを示した。

第3章では P450ALK の基質特異性の解析系を作成している。P450ALK を持たない *Saccharomyces cerevisiae* や大腸菌での P450ALK1 の生産が困難であったため、*Y. lipolytica* での選択的生産のため、構成的で強力な *TEF1* プロモーターの直下流に His タグが付く発現ベクター (pSUHT) を構築した。このプロモーターはグリセロール培地における顕著な発現が認められている。しかし、グリセロール存在下で機能ある P450ALK1 の生産は認められず、一方、*n*-デカン存在下では高発現が認められた。この結果から、*Y. lipolytica* では、機能ある

P450ALK の合成過程がグリセロール存在下では抑制されることを示した。そこで、申請者はアルカン培地で強く発現する主要 P450ALK コードする *YIALK1* と *YIALK2* の二重破壊株によって目的の P450ALK の高生産を行うこととした。また、8 種類の *YIALK* 遺伝子について、単独 (8 種類) および二重破壊株 (28 種類) を作製し、様々な培地での生育を野生株と比較して、P450ALK1 と P450ALK2 がアルカンの代謝に主要な役割を担っていることを示した。

第 4 章では *n*-ヘキサデカンの細胞内への輸送に関する解析の結果を述べている。まず、野生株を用いて *n*-[1-¹⁴C]ヘキサデカンが取り込まれる速さを経時的に測定する条件等を検討した。*YIPEX10* 破壊株を用いてアルカンの取り込み速度を調べたところ、*YIPEX10* 破壊株あるいは *YIPEX5*、*YIPEX6* 破壊株でも取り込みが著しく抑制された。すなわち、ペルオキシソームの異常によってアルカン代謝に関与する遺伝子の発現の抑制と、アルカンの細胞内への取り込みの抑制とは、共通の機構によるであろうことを示唆した。

以上本論文は、アルカンを資化して生育する酵母の、アルカン利用に関わる酵素系の調節に関して特に遺伝子のレベルにおいて解析し、いくつかの有用な新知見を得たものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。